

Н.Н. КАРКИЩЕНКО

АЛЬТЕРНАТИВЫ БИОМЕДИЦИНЫ

Том 2

КЛАССИКА И АЛЬТЕРНАТИВЫ ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИИ



Межакадемическое издательство ВПК
Москва
2007

УДК 61:57.089+615.9
52.8186+52.84

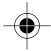
Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007. – 448 с.: 139 ил.

ISBN

На основе общей теории систем, генополиморфизма человека и животных, собственных данных об унитропности рецепторных механизмов, внутриклеточной траслокации лигандов и нейровизуализации, предложены новые фармакологические, математические и информационные модели эффективности, безопасности и скрининга оригинальных лекарств, кальмативов и инкапаситантов. В монографии даны оценки валидности и релевантности стандартизованных и альтернативных биомаркеров, батарей тестов и моделей для инновационной фармакологии, токсикологии и нелетальных технологий. Они основаны на биоэтических принципах перехода от экспериментов на животных–моделях к этногеномному, фармакопротеомному и компьютерному дизайну на «моделях животных», с использованием биомедицинских и нанотехнологий.

Издание одобрено и рекомендовано к печати Президиумом РАРАН.

Karkischenko N.N. Biomedicine alternatives. Part 2. Classical and Alternative Pharmacotoxicology. M.: VPK, 448 p.: 139 ill.




The second part of the present book focuses on new pharmacological, mathematical and informational models of effectiveness, safety and screening of original medicines, calmants and incapacitants, based on general system theory, human and animal genopolymorphism, self-obtained data on unitropism of receptor mechanism, endocellular ligands translocation and neurovisualisation. This part of the book includes estimations of validity and relevance of standard and alternative biomarkers, test batteries and models used in innovative pharmacology, toxicology and non-lethal technologies. They are based on bioethical principles of transition from experiments on animal model to ethnogenomic, pharmacoprotheomic and computer-based design on “models of animals”, subject to biomedical- and nano- technologies.

Karkishchenko N.N. Les alternatives de la biomédecine. 2éme partie. La pharmacologie classique et alternative. M.: VPK, 448 p.: 139 ill.

La deuxième partie du livre porte sur les nouveaux modèles pharmacologiques, mathématiques et informatiques de l’efficacité, la sécurité et le screening des médicaments originels, des calmants et des incapacitants, basés sur la théorie générale du système, le genopolymorphism humain et animal, les données obtenues par l’auteur sur l’unitropism du mécanisme récepteur, la translocation des ligands endocellulaires et la neurovisualisation. Cette partie du livre inclue également les évaluations de la validité et la conformité biomarqueurs standardisés et alternatifs, des batteries de tests et des modèles utilisés dans la pharmacologie innovatrice, la toxicologie et les technologies non létales. Elles sont basées sur les principes bioéthiques de la transition des expériences sur les modèles animales au design des «modèles de l’animal» à l’aide de l’ethnogènomie, la pharmacoprothéomie et du design informatique, tout en utilisant les technologies de la biomédecine et les nanotechnologies.

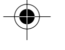
ISBN

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМ 2

КЛАССИКА И АЛЬТЕРНАТИВЫ
ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИИ





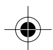




Близкой моему сердцу семье
и верным друзьям
посвящается

ПРЕДИСЛОВИЕ

Большое количество программ использования различных животных обеспечивает развитие и совершенствование биомоделей, соответствующих физиологическим и патологическим процессам у человека. Животные-модели являются достаточно адекватными объектами для понимания болезней человека, но имеют и ограничения в научном обосновании соответствия для развития инновационных технологий, оценки токсичности различных веществ, фармакодинамики и фармакокинетики новых лекарств.





Концепция *биоцентризма* на протяжении последних десятилетий характеризуется непримиримостью научных идей сторонников *антропоцентризма* и *зооцентризма.* В последнем случае они подкрепляются биоэтическими рассуждениями на основе трех R (Replacement, Reduction, Refinement). Их конечная цель – полное исключение животных из исследований и замена их альтернативными моделями. Стоит в этой связи вспомнить Иммануила Канта, подчеркивавшего, что «этика есть философия доброй воли, а не только доброго действия». Поэтому, анализируя пределы и возможности использования животных в лабораторных исследованиях и замены их альтернативными моделями, мы воспользовались старинным русским понятием *изволение,* синонимически и семантически, на наш взгляд, более точным, чем не сразу воспринимаемая расшифровка смысла трех R.

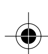
Приемы гемологической рекомбинации, по аналогии с генами человека, позволяют с учетом трех R получить генетически модифицированных мышей, а с помощью дальнейших генетических реверсий создавать необходимые линии любых животных-моделей с заданными свойствами. Однако трудоемкость этого процесса, неэффективность методов мутагенеза, слабая трансмиссия линий генной мутации, низкая жизнеспособность особей и различные побочные проявления заставляют искать новые *альтернативы* в виде перехода от биомоделирования на животных-моделях к созданию «моделей животных».

Это, в свою очередь, стимулирует развитие научно обоснованных принципов валидации и релевантности альтернативных моделей, прежде всего для фармакотоксикологии. Переход от концептуальных представлений *изоморфизма* моделей и прототипа к прикладным аспектам генополиморфизма процессов метаболизма лекарств, ксенобиотиков и токсикантов создает надежный базис *фармакогенополиморфизма* как нового течения научного поиска.

Фармако- и токсикогенетические исследования все более ориентируются на оценку межвидовых и внутривидовых модуляций скорости и характера направленного транспорта и биотрансформации лекарств, связанных с наследственными мутациями в генах, кодирующих необходимые ферменты. В соответствии с новой медико-социальной парадигмой поиск инновационных лекарств следует вести в направлении двух больших классов заболевания. *Первый класс* – это наследственные болезни, развивающиеся путем передачи дефектных генов от родителей к потомству. *Второй класс* составляет более 90% всех болезней человека и объединяет так называемые социально значимые заболевания. В обоих случаях болезни связаны с геномом человека, но во втором классе дефекты во вполне корректных генах возникают в связи с нарушением регуляции их экспрессии уже в процессе заболевания.

Исследования фармакогенополиморфизма в клинике основываются и развиваются на использовании биомаркеров, разработках генетических микрочипов (micro-array-technology) для оценки батарей мутантных аллелей, тестирования ключевых ферментов, транспортеров лекарств и фармакомоделирования этих процессов. Клинические результаты, в свою очередь, вносят вклад и дают импульсы в поиске новых альтернативных и животных моделей для скрининга инновационных средств и поиска «этнических» лекарств.

Важнейшей процедурой на пути лекарства от пробирки до госпитальной койки является оценка его токсичности, а также неблагоприятных и отдаленных побочных эффектов. Они исследуются и контролируются на всем протяжении его доклинической и клинической «жизни». Известная дискуссионность в подходах к оценке токсичности лекарств дала нам основание представить современные взгляды, подходы и принципы стандартизованного и альтернативного токсикомоделирования.




Наряду с классическими моделями рассмотрены входящие в мировую практику новые животные-модели и их альтернативы. Альтернативные биомодели гено- и эмбриотоксичности, батареи тестов, токсикокинетические модели развиваются в направлении *токсикопротеомики*. Структурно-экспрессионная и функциональная клеточно-картируемая протеомика использует дорогостоящее оборудование и недешевые реактивы. Но время течет, жизнь меняется и в обозримом будущем будет трудно себе представить любую фармакотоксикологическую лабораторию без протеомных технологий.

Прежде чем оказать фармакологическое и токсическое действие и элиминироваться, вещество должно попасть в организм, достигнуть органа-мишени, вступить в лиганд-рецепторые взаимоотношения и биотрансформироваться. *Транслокации* внутриклеточного транспорта лекарств зачастую выпадают из поля зрения фармакологов. И напрасно. Ведь именно на этом этапе развиваются процессы изменения лекарством поведения клетки, в чем заключено зерно будущего поиска для скрининга инновационных лекарств. Унитропность GPCR-рецепторов, адаптерные и G-белки, транспортные механизмы фармакоэндоцитоза и CURL-систем позволяют взглянуть на индивидуальные проявления молекулярного действия вещества, его оценку и выбор будущего препарата с позиций системного анализа.

Дуальность и унитропность системы GPCR, выявление генов как потенциальных мишеней действия инновационных лекарств, создание молекуляр-

ных моделей белков-рецепторов, компьютерный дизайн пролекарств, основанный на оптимизации молекулярных белковых моделей и выборе генов-мишеней, составляют основу *фармакопротеомики.* Развитие нанотехнологий, геномики и протеомики ведет к систематизации огромного количества возможных рецепторных макромолекул как мишеней для регуляторного воздействия и направленного транспорта лекарственных веществ.

Конформационные изменения в макромолекулах-рецепторах составляют основу передачи химического сигнала трансмиттеров и действия лекарств. В живых системах они управляются сверхслабыми электромагнитными полями. Эти реакции могут модифицироваться ЭМИ и упругими акустическими волнами экстракорпорального происхождения. Классическое и альтернативное моделирование, основанное на этих принципах, привело к возникновению и развитию *нелетальных технологий.* Многие известные вещества перешли из категории клинических психотронных средств в категорию *инкапаситантов* и *кальмативов.*

В век глобализации террора необходимо пресекать агрессивные устремления террористов и защищать невинных заложников их злонамеренных амбиций. Это стимулирует исследования в области фармакотоксикомоделирования. Создание мощных кальмативов и их сочетаний с ЭМИ и инфразвуком становится столь же актуальной государственной задачей, как и поиск лекарств для лечения социально значимых болезней. Хотя многие кальмативы являются близкими «родственниками» клинических препаратов, изменения целеуказаний для их использования требуют разработки новых альтернативных и животных моделей для *нелетальных технологий.*




При экспериментальной и клинической оценке классических нейропсихотропных средств и кальмативов исследователь сталкивается с *дискретностью* фармакоструктурных параметров и *непрерывностью* фармакодинамических процессов. Поскольку электроэнцефалограмма человека и животных является единственным динамическим неальтерирующим методом оценки *интрацентральных взаимоотношений* мозга, которые *вероятно* составляют основу психических функций, ее изменения под влиянием лекарств представляют особый интерес. Сравнение формирования и проявлений ЭЭГ у различных животных и человека указывает на наличие в ее реализации генетического контроля. Фармакогенетическое моделирование и нейровизуализация привносят новые краски в палитру фарм-ЭЭГ, ее динамических спектров, кластеров, аттракторов и фракталов.

Использование современных методов математического моделирования, в том числе *теорий хаоса,* позволяет рассматривать фарм-ЭЭГ как нечто среднее между стохастическими и детерминированными процессами в заведомо *нелинейных системах.* При фармакомоделировании интерес представляют даже не конкретные значения характеристик фарм-ЭЭГ, а их изменения под влиянием внутренних и внешних факторов, в особенности лекарственных препаратов. Не забегая вперед, все же следует подчеркнуть, что несмотря на индивидуальные черты действия отдельных психотропных средств, в целом для них характерна, по нашим данным, способность снижать *хаотичность* и повышать *детерминированность* фарм-ЭЭГ. Эти лекарства, в силу их *психоунитропизма,* понижают число степеней свободы, упорядочивают субиерархии биосистем мозга, делают их более «жесткими» в реагировании на внешние и внутренние воздействия.

Общая теория систем Людвига фон Берталанфи существенно раздвигает рамки биомоделирования и его составляющей – фармакомоделирования. Поиск информативных параметров психики, возможность их коррекции психотропными средствами позволяет выделить *биопсихосоциальные* элементы комплексной природы человека с целью поиска адекватных альтернативных и животных моделей. Моделирование информационных процессов психики создает доказательную базу в самых разнообразных живых системах и объектах: от одноклеточных организмов до приматов. С точки зрения фармакомоделирования важно, чтобы искомая биосистема (как модель психики) была способна сохранять свои *границы* и *взаимосвязи* с внешней средой, находилась на соответствующем уровне *иерархии* и открытости для постоянного обмена материей, энергией и *информацией,* осуществляла бы *саморегуляцию* по принципу обратной связи. Фармакоинформационное моделирование выявляет взаимоотношения социального и биологического, сознательного и бессознательного не только у человека, но и у животных-моделей.




На данном этапе развития фармакотоксикологии перед исследователем возникает дилемма. *Во-первых,* насколько животные-модели и прототип являются подобными и различными в аспекте *экстраполяции,* и каковы возможности и биоэтические пределы использования животных? В последнем случае это уже предмет научной этики, когда, говоря словами Иеремии Бентама, «вопрос не в том, одарены ли животные разумом, а в том – могут ли они страдать». *Во-вторых,* осознавая невозможность полного исключения животных из фармакотоксикологических экспериментов, следует все же активно искать новые модели в качестве биомедицинской альтернативы.

Альтернативное моделирование устремлено в направлении клеточных, молекулярных и нанотехнологий. Использование нанокристаллов, фуллеренов, липосом и полимеров открывает новые горизонты для создания нанофармакологических моделей. Резюмируя изложенный в книге фактический материал и современные представления об использовании животных и альтернативных моделей в исследованиях лекарств, ксенобиотиков и токсикантов, мы надеемся, что пытливый ум экспериментаторов проложит новые пути фармакомоделирования в будущее.

Глава 1

От животных-моделей к моделям животных

Исследователи, столетиями использовавшие для экспериментальных целей различных животных, вряд ли думали, что в дебатах начала XXI века по поводу применения животных в экспериментах научно обоснованных аргументов будет значительно меньше, чем этических. Наибольший интерес вызывают дебаты о том, что все ли, а если нет, то какие животные-модели и моделируемый объект являются *подобными* или *различными*. В достаточной ли степени животные могут быть подобными для экстраполяции данных, полученных в модели, на прототип. До степени какого различия, если модели являются невалидными, они все же подобны оригиналу и можем ли мы использовать их?

Такой анализ не носит чисто эмпирического или концептуального характера. Фактически, история исследований на животных показала, что проблема приобрела полярно противоположные точки зрения. В этой главе мы коснемся фундаментальных и практических биомедицинских и психологических сторон исследований, а не только тестов на животных. Цель и процедуры в генетических и экспериментальных направлениях проводимых исследований, а соответственно значение и местоположение таких биомоделей и валидация, будут ясны лишь после «привязки» к конкретным условиям и задачам, что явится предметом последующего изложения.

Гуманность в биомедицинских исследованиях

Доказательства в пользу альтернативных моделей высказывают защитники животных и противники вивисекции в качестве *паранаучных* аргументов, но существуют подобные восприятия и в виде *этических* аргументов. Следует помнить, что их предшественники в XIX веке, искавшие непримиримые различия между человеком и животным и ратовавшие за исключительность человека как социального класса,

породили новый термин, с тех пор получивший название «*гуманный*». Качественное перевооружение инструментальной базы исследований в биомедицине начала XXI века не только увеличило объем и точность экспериментов на животных, но и повлияло на ментальность ученых.

NB! Гуманизация науки привела к ограничению числа острых вивисекционных опытов в физиологии и хронических – в токсикологии и фармакологии. Вследствие интернационализации норм *биоэтики* экспериментальных систем они стали гуманнее, эффективнее и осмысленнее.

Первые ростки гуманизма обнаружились в V веке до нашей эры в Афинах. Следующие этапы – это эпоха Возрождения и уже XIX и XX века. Гуманизм (от лат. *humanus* – человеческий, человечный) как коллективное мировоззрение и культурно-историческая традиция носит как *дескриптивный* характер, предлагая людям определенную картину мира, так и *прескриптивный,* предписывая человеку некоторые правила поведения. По сути, гуманизм – это система научных знаний, основными блоками которой являются антропологические, философские, общебиологические, биомедицинские, психологические, юридические, экологические, педагогические и иные знания. Гуманизм является осознанной установкой на осмысленную человечность, но не *антропоцентризм*. Утверждая, что человек для человека – высшая ценность, гуманизм отрицает возвеличивание, обожествление человека, его противопоставление остальному живому миру. Гуманность человека особенно ярко проявляется в его отношении к животным. Недаром говорится, что жестокость к животным порождает жестокость во всем [2, 8].




Полярные взгляды на характер и экстраполяционные биоэтические допущения в исследованиях на животных формировались тысячелетиями. В середине первого столетия от рождества Христова *Клавдий Гален* пропагандировал для познания человека *широкое использование вивисекции на животных*, а за столетие до него *Корнелий Цельс* в сочинении «De Medicine» доказывал *неприемлемость* для правильной оценки функций живого организма *использования вивисекции* и болезненных экспериментальных манипуляций.

Биоэтика основывается на достижениях биологии, медицины, логики, философии [8, 15]. Впервые термин *«биоэтика»* в 1971 году ввел Р.В. Поттер. По законам биоэтики все живые существа имеют право на жизнь, продолжение рода и на защиту законом. Некоторые национальные и европейские законодательства, регулирующие проведение экспериментов на животных, требуют, чтобы всякий раз, когда это возможно, применялись методы без *использования животных.*

В России началом развития *биоэтики* считается 1865 год, когда было создано Российское общество покровительства животных. Идея защиты животных и природы раньше чем в других странах проявилась в Великобритании, где в 1926 году было основано Общество по охране животных Лондонского университета (с 1938 года – Университетская федерация защиты животных, UFAW). Эта организация сыграла и играет важнейшую роль в развитии этических концепций экспериментирования на животных и в становлении практических направлений, улучшающих эксперименты на животных. Группа исследователей из разных стран, созданная в рамках актива UFAW, предприняла попытку разработать принципы гуманной экспериментальной техники [32].

NB! Биоэтика – это философски-прикладная область знания, охватывающая моральные, юридические и социальные проблемы, имеющие давнюю историю, такие как отношение человека к диким и домашним животным, а также проблемы, возникшие сравнительно недавно в связи с бурным развитием биотехнологии и биомедицинских исследований.

В 1982 году Генеральной Ассамблеей ООН принята *Всемирная хартия природы*, а в 2000 году принята *Декларация Земли* – первые международные документы, на основании которых всем формам жизни обеспечивается существование.




В России в 1999 г. Государственной Думой подготовлен проект федерального закона «*О защите животных от жестокого обращения*». В статье 9 говориться, что «обращение с животными при использовании их в научных экспериментах, биологическом тестировании, получении биологических препаратов ... допускается только в случае, если *отсутствует возможность заменить животных альтернативными моделями и объектами*».

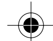
Проведение на экспериментальных животных процедур, независимо от их целей и видов животных, при которых возможно нанесение травм или причинение боли, должно осуществляться при обязательном обезболивании. При работе с экспериментальными животными нельзя оперативным путем лишать их возможности издавать звуки, применять травматические методы и приемы при взятии животных из мест их содержания, проводить на животных с высокоорганизованной ЦНС (обезьяны, мини-свиньи, собаки, кошки и др.) процедуры, приводящие к травмам, увечью и гибели [5, 8, 15, 16, 20, 25]. Всем экспериментальным животным после проведения процедур должен обеспечиваться квалифицированный уход.

Количество животных должно быть минимальным. В ряде стран желающие получить лицензию на осуществление работ с лаборатор-

ными животными должны представить детальную программу мероприятий по *сокращению, усовершенствованию* и *замене* экспериментов с использованием животных. Это и есть предмет биоэтики.

Необходимость сокращения, усовершенствования и замены экспериментирования на животных, перехода к исследованиям на основании компромиссных подходов отражена в многочисленных научных и публицистических работах [8, 15, 19, 26, 27, 29, 35].

В последние годы наблюдается жесткое противостояние между теми, кто защищает методичное и прогрессивное *сокращение, усовершенствование* и *замену* экспериментов на животных, и теми, кто считает, что подобные эксперименты не могут быть оправданы никакими соображениями, если принять во внимание вероятные страдания животных. В этой ситуации четкую, взвешенную позицию занимает «Фонд по замене животных в медицинских экспериментах» (FRAME). Эта международная организация последовательно выступает как против действий любых экстремистских групп, стремящихся возбудить общественное мнение требованиями исключительного использования альтернативных методов исследований, так и против предоставления безграничной свободы ученым, которые проводят биомедицинские исследования на лабораторных животных и на волонтерах [8, 15, 21, 28].




NB! Противники проведения исследований на животных, как правило, говорят об их страданиях и соблюдении «прав», тогда как сторонники черпают свои аргументы в необходимости продолжения исследований над животными с тем, чтобы ускорить прогресс в медицине и биологии, найти новые средства предотвращения и лечения болезней.

Наука нуждается в общественном согласии, а это как раз и предполагает принципы сокращения, усовершенствования и разумной замены экспериментирования на животных, суть которых состоит в том, чтобы, обеспечив гуманное отношение к животным, сохранить главное – проведение исследований в интересах жизни и здоровья людей.

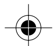
Биоэтические нормы и принципы 3R

Практически единственным методом контроля и экспертизы лекарств, а также изучения биологических реакций на воздействие экстремальных факторов являются экспериментальные исследования *только на животных*. Эти исследования способствуют изучению и оценке возможных последствий, ожидающих человека под влиянием экстремальных воздействий, и разработке мероприятий, способных защитить его от этих опасностей. Поэтому, нередко, для реализации таких

задач в экспериментах на животных приходится применять методические приемы, *недопустимые* в исследованиях *на человеке*. Существует общепризнанная необходимость строго придерживаться принципов гуманного отношения к животным как объектам исследования. Наиболее общие принципы:

- ✓ убедительные основания в необходимости планируемых экспериментальных исследований и невозможность замены животного какой-либо моделью или альтернативным объектом исследования;
- ✓ минимизация количества привлекаемых к исследованию животных за счет стандартизации условий эксперимента, повышения информативности методических приемов, исключения факторов, увеличивающих разброс экспериментальных данных;
- ✓ принятие необходимых мер, исключающих страдания животных;
- ✓ обязательное обеспечение надлежащего ухода за животными с учетом особенностей их этологии;
- ✓ гуманное отношение к животным (студенческая лабораторная работа, учебно-научный эксперимент, тестирование лекарственного препарата и др.).

Биоэтика в данном аспекте склоняется в сторону *парадигмы биоцентризма*, ибо вместо равнодушия к страданиям животных «ради высоких научных целей» ставится задача минимизировать эти страдания. Право на использование животных в экспериментах имеют высшие учебные, научно-исследовательские и лечебные учреждения, которые имеют специальные лаборатории.



Экспериментальную работу с животными могут проводить только те специалисты, у которых есть разрешение руководства госучреждения, имеющего лицензию на проведение исследовательских работ с использованием животных. Кроме того, эти специалисты несут ответственность за соблюдение правил содержания и использования животных. Исследователи, проводящие эксперименты, и вспомогательный персонал должны иметь достаточный опыт. Сотрудники экспериментальной лаборатории, имеющие медицинское, ветеринарное или зоотехническое образование, аспиранты и студенты должны быть ознакомлены с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» № 755 от 12.08.1977 г. [8, 10, 14].

При публикации результатов исследований экспериментатор должен обязательно указать, что проведение данного эксперимента было санкционировано решением Комиссии по биологической этике (КБЭ). Получение разрешения ответственным исполнителем на проведение эксперимента на лабораторных животных возможно только после того, как исполнитель представит в комиссию по биоэтике «Заявку на про-



ведение биоэтической экспертизы», «Программу экспериментального исследования на животных» и «Обоснование необходимости использования животных в данном исследовании» по установленной форме.

Исследователь должен обязательно представить письменное описание эксперимента, содержащее формулировку цели исследования, описание всех экспериментальных процедур и методических приемов, оценку характера и степени дискомфорта и риска возможных осложнений. Описание должно включать физическую активность, диету, прием препаратов, проведение нагрузочных и функциональных проб и др. При планировании эксперимента на животных исследователь должен руководствоваться принципами «трех R» (replacement – замена болезненных для животных экспериментов опытами, не причиняющими страданий; reduction – уменьшение числа опытов с животными; refinement – улучшение методики с целью облегчения страданий подопытных животных) [8, 14, 31].Во всех случаях следует рассмотреть возможность использования альтернативных методов.

NB! Альтернативный метод – это метод, применяемый для уменьшения (reduction), очистки (refinement) или замены (replacement) экспериментов на животных в биомедицинских исследованиях при проведении тестов с квалификационной или образовательной целью.




У. Рассел и Р. Берч в 1959 году издали книгу «Принципы гуманной экспериментальной техники» (*The Principles of Humane Experimental Technique*) [30], в которой постулируется, что «если используется набор принципов экспериментирования, то критерии гуманизации являются лучшими из того, что мы можем предложить». В монографии Рассела и Берча обоснована концепция гуманного использования животных в экспериментах, которая получила название «*Концепция трех R*». Концепция трех R имеет биологическое содержание и поэтому ее с полным правом можно именовать «*Биоэтическая концепция трех R*», в основу которой легли три основных положения – Replacement, Reduction, Refinement.

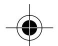
Replacement: выбор и замена

Replacement – *замена* в опыте, когда это возможно, *высокоорганизованных животных* менее развитыми живыми объектами, альтернативными методами: экспериментами на культуре клеток и тканей, изолированными органами, физико-химическими и биохимическими системами, экспериментами на микроорганизмах и растительных объектах, компьютерными и математическими моделями. Есть неплохие результаты в использовании культур клеток тканей (методы *in vitro*)

с целью определения общей токсичности химических соединений для человека и животных, для оценки иммунотоксичности, нефротоксичности, гепатотоксичности, нейротоксичности, фототоксичности, экотоксичности, канцерогенности. Успехи в разработке биополимеров позволили получить структуры, эквивалентные тканям человека.

Активные приверженцы биомоделирования второго порядка (то есть без использования животных) считают, что необходимо оказать полную поддержку широкому распространению среди научной общественности информации об альтернативных методах, имеющихся в стране или регулярно описываемых во многих международных журналах по альтернативным методам, наиболее популярным из которых признан *ATLA* (Alternatives To Laboratory Animals).

В лабораторных исследованиях используются различные представители животного мира. Поскольку в качестве биомоделей широко используются *аутбредные* и *линейные* млекопитающие, к числу которых относятся мини-свиньи, обезьяны, собаки, кошки, кролики, крысы хомяки, мыши, и др., то возникает вопрос: а существуют ли унифицированные принципы выбора животных-моделей для эксперимента?



Медико-биологические эксперименты с использованием животных можно разделить на следующие *основные группы*. Для экспериментов, в которых лабораторные животные служат *инструментом измерения* активности каких-либо веществ, препаратов, например, вакцин, сывороток или гормональных средств, по М. Фестингу [21, 22, 23], генотип несущественен, вопросы экстраполяции необязательны, поэтому для «биопробы» можно использовать гибриды как линейных животных, так и аутбредных.

Для экспериментов, в которых предполагается *моделирование патологических состояний* (онкологические исследования, изучение процессов воспаления, иммунитета, мутаций), существенно то, насколько велика роль генетических факторов в развитии изучаемого состояния [5, 8, 21]. Если роль генетических факторов достоверно велика (как, например, в возникновении злокачественных опухолей), то их можно проводить только на *определенных линиях*. Если они прямо зависят от генетических факторов (различные наследственные болезни), то для их изучения пригодны *только аналогичные мутантные формы* мышей, крыс и т.д.

Для выполнения исследований влияния *различных веществ* и *факторов внешней среды*, когда изучается реакция живого организма на эти воздействия, и в конце исследования возможна постановка вопроса об *экстраполяции на человеческую популяцию*. Для подобных исследований ограничиться выбором одной линии или гибридной комби-



нации можно только в том случае, когда роль генетических факторов в исследуемом процессе очень мала. Иногда выбор линий облегчается тем, что по изучаемому вопросу есть информация, входящая в характеристику линии.

Существуют линейные различия у животных по степени *иммунного ответа*. Часто линии, низкочувствительные к патогенному действию антигена, отвечают на него высоким титром антител. Например, линия мышей BALB/c малочувствительна к стафилококковой инфекции, но дает высокий иммунный ответ на вакцину пневмококков группы А, а у мышей линии C57BL/6 отмечена обратная зависимость [5]. В то же время имеются отчетливые параллели, как, например, в случае усиления чувствительности к аудиогенным припадкам инбредные линии мышей располагаются в такой последовательности: G57BL/6, BALB/c, SM, CBA, SJL, AKR. FP, 129, LP, DBA/2.

NB! Тестирование целесообразно вести с использованием наиболее чувствительных животных-моделей, однако их линии могут проявлять совершенно *неожиданную специфичность*. Необходимость экстраполяции на весь вид и далее на человека требует проведения опытов на нескольких различающихся линиях.




Заранее трудно предсказать, как будет реагировать та или иная линия животных на новый фактор, подлежащий изучению. Для такого поискового опыта нужно использовать набор из нескольких видов животных или их линий разного происхождения. *Однотипный ответ* будет означать малое влияние генотипа. В таком случае выбор объекта определяется лишь требованием воспроизводимости и экономическими соображениями. *Разнотипный ответ* на разных линиях будет означать существенную роль генотипа. В этом случае крайние варианты укажут на возможный размах вариаций изучаемого признака в популяции. Для дальнейших опытов необходимо, в зависимости от специфики исследования, отбирать или *наиболее чувствительную линию*, или *две оппозитные линии*. Если нет необходимых сведений о специфике линий, то при выборе можно руководствоваться данными об их родстве, отбирая для первого эксперимента *максимально различающиеся*, неродственные линии.

При выборе для эксперимента тех или иных линий некоторое представление о степени их генетического различия дают результаты математического анализа скелетных измерений. В экспериментах, результаты которых важны для *межвидовой экстраполяции*, а также в экспериментах с длительным сроком наблюдения, важна устойчивость организма животных к изменяющимся условиям внешней среды. Подобной спецификой обладают фармакологические, токсикологичес-

кие и гигиенические исследования. Для таких исследований можно рекомендовать использование тетрагибридных животных, получаемых скрещиванием линий с *разной специфичностью* в отношении изучаемого признака.

Отбор той или иной линии основывается прежде всего на генетических и биологических особенностях каждой линии. Используются другие категории генетически контролируемых животных: гибриды первого поколения (F1) от скрещивания двух инбредных линий, конгенные и конгенно-резистентные линии, мутантные линии и стоки, сложные гибриды (тетрагибриды), рандомбредные линии. Генетическая характеристика и специфика каждой из перечисленных категорий животных дана нами ранее [5]. Выбор животных той или иной категории определяется целью и характером самого исследования.

В предыдущей книге [5] мы привели обширные таблицы выбора для экспериментов и исследований адекватных животных-биомоделей, полученных в результате сложных генетических преобразований. В таблицах отражены поведенческие реакции, особенности метаболических процессов, уровни артериального давления, массы органов и тканей, наличие спонтанных опухолей, восприимчивость или резистентность к инфекциям и инвазиям, рождаемость, плодовитость, размеры детенышей, биохимические параметры крови, органов и тканей, чувствительность к ксенобиотикам и фармакологическим агентам, реакции на радиационные воздействия и различные факторы окружающей среды. Исследователь сам найдет интересующие его феномены или проявления, а также новые данные в издаваемом Центром журнале «Биомедицина».



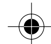

Эти данные позволяют исследователю уже в первом приближении оценить возможности выбора оптимальных животных-моделей при планировании экспериментов, их проведении и определении сравнительных данных экстраполяционных процедур в процессе биомоделирования. По ходу изложения мы будем расширять и комментировать эту проблему, а в издаваемой Центром РАМН литературе можно найти все то, что к данному периоду времени накоплено в мировой практике и науке по данному вопросу. Выбор животных и их замена на более низкоорганизованные должны осуществляться, прежде всего, исходя из задач и целей исследования.

NB! Животные-модели, используемые в лабораториях для научных и практических целей, должны быть здоровы, обладать специфическими особенностями, например, восприимчивостью к исследуемым инфекциям, чувствительностью к исследуемым веществам и др., отличаться дешевизной разведения и содержания.

Учитываются их видовые особенности, все шире применяют трансгенных, нокаутных животных и гнотобиотных или SPF-животных, то есть свободных от той или иной микрофлоры [1, 4, 11, 12, 13, 23]. Для исследований по генетике, микробиологии, вирусологии, токсикологии, радиобиологии чаще используют мышей, хомяков, крыс, для физиологических опытов – собак, кошек, кроликов, обезьян, лягушек, а также грызунов. Нередко опыты ставят на черепахах, рыбах, птицах и др. Находят применение многие беспозвоночные и простейшие. Все чаще пользуются для опытов эмбрионами птиц, рыб и т.д., культурами тканей и изолированными органами.

Криотехнологии

Из эмбрионов мышей, замороженных в жидком азоте 12-15 лет назад, были успешно получены молодые особи животных. Несмотря на предпринятые экспериментальные попытки, применить данный метод сохранения к другим видам, включая человека, оказалось не просто. Предстоит глубже изучить этот метод, прежде чем использовать его на постоянной основе в отношении различных видов живых существ [23]. Основной целью криогенной заморозки эмбрионов мышей является достижение гарантии того, что вся линия или популяция не будет потеряна в результате болезни или несчастного случая. Более того, это – наиболее экономичный метод поддержания значительного количества будущих особей, необходимости в которых в данный момент нет, но может вскоре возникнуть [5, 22, 36].




NB! Криотехнологии могут использоваться для транспортировки коллекционных линий с целью предотвращения генных изменений в инбредных линиях, для экспериментов в преимплантационной эмбриологии, а также создания популяций, позволяющих получить *высококачественные* и *достоверные* экспериментальные данные.

Для проведения успешного криогенного сохранения эмбрионов мышей необходимо недорогое, но качественное оборудование, реактивы высокой степени очистки, но главное *специалисты* в области преимплантационной эмбриологии, имеющие успешный опыт криогенного сохранения эмбрионов. Оборудование, необходимое для криогенной заморозки, включает в себя частично опорожненные колбы, приспособления для обращения с жидким азотом, CO_2-инкубаторы, термопары, регистрирующий прибор, микроскопы с цифровой камерой и компьютером.

Донорами эмбрионов обычно являются препубертатные мыши в возрасте около 21 дня. С помощью сыворотки беременной кобылы и

человеческого хорионического гонадотропина у самок вызывают гиперовуляцию и затем их спаривают с племенными самцами. Доказательством успешного спаривания является наличие вагинальной пробки, со дня ее обнаружения начинается отсчет дней. На третий день мышь убивают и извлекают матку и фаллопиевы трубы. Из фаллопиевых труб с помощью соответствующего инструмента вымываются эмбрионы, которые на этот момент должны находиться на стадии 8-клеточного развития. Затем из общей массы эмбрионов выбраковываются поврежденные или недоразвившиеся.

Оставшиеся эмбрионы в среде с соответствующим криопротектором (диметилсульфоксид) помещают в пробирки или трубочки, подготовленные для заморозки. Далее они охлаждаются до почти полной заморозки, и колбы закупориваются кристаллом льда для предотвращения переохлаждения. После этого эмбрионы замораживают. Обычно скорость охлаждения низкая (около 0,4 градуса в минуту). С момента достижения эмбрионами температуры -80 ^{o}C скорость охлаждения можно увеличить, пока степень заморозки не будет соответствовать температуре жидкого азота (-196 ^{o}C). При этой температуре эмбрионы могут сохраняться неограниченно долго.




Когда возникает необходимость в эмбрионах, их размораживают, используя принятый в лаборатории метод. Обычно это происходит при комнатной температуре или в ванне с температурой воды 37 ^{o}C. Неповрежденные эмбрионы отбирают, отмывают и выращивают 24 часа в подходящей среде в CO_2-инкубаторе. Если эмбрионы жизнеспособны, они развиваются в бластоцисту, подходящую для имплантации.

За 2 дня до размораживания эмбрионов, нескольких псевдобеременных мышей, будущих суррогатных матерей, подготавливают к приему эмбрионов путем спаривания со стерильным самцом (стерилизованным с помощью вазектомии или генетически стерильным). Будущая суррогатная мать получает анестезию, ей делают один кожный надрез и далее по надрезу в верхней брюшине по обеим сторонам от позвоночника с тем, чтобы обнажить боковые стороны матки. С обеих сторон матки делается по маленькому надрезу, через которые помещается от 4 до 6 эмбрионов. Кожный надрез закрывается с помощью зажима. Если операция прошла успешно, через 18-19 дней должны родиться мышата. Квалифицированный специалист может получить 30-40% жизнеспособных молодых особей из общего количества замороженных эмбрионов.

Reduction: адекватность и стандартизация

Reduction – это прежде всего достижение воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных; адекватный выбор лабораторных животных; использование стандартных по микробиологическим, генетическим и экологическим параметрам животных; оптимальное планирование и, что крайне важно, использование статистических методов не только при обработке полученных данных, но и на стадии планирования. Одним из наиболее надежных путей снижения количества животных, используемых в экспериментах, является дальнейшее развитие и осуществление стандартизации лабораторных животных по генотипу, микрофлоре и экологическим параметрам.

Благодаря уменьшению количества переменных факторов, стандартизация может помочь в получении более надежных результатов на меньшем количестве животных [20, 21, 31]. Исследователи должны владеть информацией о значительном количестве моделей, уже имеющихся для исследований. Отсутствие соответствующей информации или ее недоступность для широкой научной общественности может стать одним из факторов неправильного использования лабораторных животных в экспериментах. Вопросы оптимизации и аллометрии при использовании лабораторных животных и планировании экспериментов подробно изложены нами [9].




Необходимо оказать полную поддержку широкому распространению среди научной общественности информации о моделях, имеющихся или регулярно описываемых во многих биомедицинских журналах. В качестве примера можно привести *American Journal of Pathology*, который в каждом номере в специальной рубрике публикует статьи по этому вопросу, а также каталог М. Фестинга и журналы *Laboratory Animals*, *Laboratory Animal Science* и *Биомедицина* [22, 23]. Широкий обмен информацией об экспериментах на животных позволяет избежать неоправданного дублирования, а грамотное планирование экспериментов и их анализ дает дополнительную и корректную информацию при гораздо меньшем количестве использованных животных [8].

Животные использовались в медицине, по крайней мере, со времен Гиппократа [3] Он писал: «Действительно, надгортанник есть крышка, очень точно закупоривающая и не дающая прохода ничему, кроме питья. Вот доказательство: если кто окрасит воду в голубой цвет или красный и даст ее выпить очень жаждущему животному, лучше всего свинье, ибо это животное не отличается ни разборчивостью, ни чистотою, потом перережет ей горло в то время, как она

пьет, то он найдет надгортанник окрашенным питьем, но эта операция не всякому удается». Чем не прообраз биомоделирования в эксперименте?

NB! Получение надежных и воспроизводимых результатов биомедицинских исследований возможно лишь при соблюдении стандартности всех слагаемых и условий проведения медико-биологического эксперимента, причем лабораторные животные являются наиболее уязвимым его звеном.

Состояние животных-объектов зависит от воздействия многочисленных экзогенных и эндогенных факторов, влияние которых далеко не всегда бывает явным и легко регистрируемым. Среди них прежде всего следует отметить факторы инфекционной и инвазионной природы. Различные, в том числе даже патогенные представители вирусной и бактериальной флоры, не всегда вызывают клинически явную картину заболевания. Часто они протекают в латентной форме или же в виде носительства. В настоящее время актуальность приобретает так называемая оппортунистическая, эндогенная инфекция, активизирующаяся при иммунодефицитных состояниях [5, 6, 7, 11].





Полноценность корма, сбалансированность всех его компонентов является важнейшим условием, обеспечивающим здоровье животного, поддержание неспецифической резистентности его организма на высоком уровне. Велико также воздействие экологических факторов на статус животного: условий его содержания и микроклимата. Все эти моменты, не учитываемые при проведении эксперимента, искажают и даже извращают его результаты [5].

Категорирование животных-моделей

Достижение современного уровня медико-биологического исследования возможно лишь при унификации всех факторов, воздействующих на организм лабораторных животных, путем строгой стандартизации как условий содержания, так и самих животных. Введение в мировую практику требований системы GLP (Good Laboratory Practice) для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие требования к стандартизации животных и состоянию их здоровья.

NB! В соответствии с международным опытом стандартность лабораторных животных обеспечивается, с одной стороны, современной технологией их разведения и содержания в барьерной системе, с другой – едиными критериями оценки состояния здоровья.

Основой этих критериев является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной и инвазионной природы: вирусов, бактерий, паразитов. То есть, стандартизация животных основана на исключении возможности возникновения явлений инфекционной и инвазионной патологии [8, 11].

Во многих странах разработаны стандарты различных категорий качества животных по состоянию здоровья. Они включают перечень возбудителей, носительство которых исключается. Чем выше категория качества животного, тем больше перечень недопустимых агентов [10]. Однако стандарты различных стран не идентичны. Единой международной классификации лабораторных животных по категориям качества, как и соответствующих стандартов, *не существует*. В связи с этим, животные, именуемые как SPF (Specific pathogen free), не имеют четкой характеристики качества и, полученные из разных источников, могут значительно различаться по своему статусу. В последние годы отмечается явная тенденция к унификации критериев качества животных и созданию единых стандартов. Примером могут служить разработки группы исследователей европейских стран: GV-SOLAS, FELASA.



Специалисты нашей страны совместно с зарубежными коллегами на основе мирового опыта также предприняли попытку создания требований к качеству лабораторных грызунов различных категорий, которые были приняты в 1989 г. на совместном совещании в Софии. Однако опыт работы по контролю состояния здоровья животных позволил видоизменить эти нормативы. Требования к качеству животных различных категорий максимально приближены к общеевропейским стандартам. Для иллюстрации этого в таблице 1.1 приведена классификация лабораторных грызунов (мыши, крысы, морские свинки, хомяки, кролики) по категориям. Это относится и к крупным животным, таким, как собаки, кошки, мини-свиньи и другие, но получение их по категориям СПФ и гнотобиотов довольно уникально.

Классификация основана на методе получения исходных для разведения животных, наличии и надежности барьера и глубине или уровне контроля статуса животного по соответствующему стандарту (требованию). Предлагается различать пять категорий качества животных [8, 12, 20]:

✓ ***категория 1***: конвенциональные животные, содержащиеся в открытой системе;

✓ ***категория 2***: улучшенные конвенциональные животные, находящиеся в барьерной системе неполного типа. Исходными животными этой категории могут быть только животные более высокого клас-

Таблица 1.1

Классификация лабораторных животных по категориям и их использование в биомедицинских исследованиях

Категория	Характеристика	Метод получения	Барьер	Контроль	Использование
1	Конвенциональные (CV)	Случайный	Отсутствует (открытая система)	Стандарт 1-й категории	В целях обучения или острые опыты
2	Улучшенные конвенциональные (MD или Minimal Deseases)	От животных более высокой категории качества	Неполная барьерная система	Регулярный по стандарту 2-й категории	Рутинные исследования в кратковременных экспериментах
3	SPF (СПФ или свободные от патогенной флоры)	От животных, содержащихся в изоляторах и ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система	Регулярный по стандарту 3-й категории	Изготовление стандартных препаратов, испытание на токсичность препаратов. Хронические эксперименты длительностью 6 мес.
4	SPF или СПФ Максимально свободные от условно-патогенной флоры	От гнотобиотических или безмикробных животных, ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система высокой степени надежности	Регулярный по стандарту 3-й категории, с использованием ПЦР	Получение культур клеток при производстве вакцин, поддержание штаммов бактерий и вирусов, перевиваемых опухолей, испытание новых фармакологических средств, проведение фундаментальных исследований иммунитета, воспаления и т.д. Оценка биологических факторов для нелетальных технологий
5a	Безмикробные (аксенные GF)	Гистерэктомия. Свободный от любой или известной формы жизни микроорганизмов	Изолятор	Регулярный на наличие ассоциированных микроорганизмов	
5b	Гнотобиотные (категории GFX)	Используются для описания животных и систем, все формы жизни в которых известны	Изолятор со специальным контролем	Регулярный, с использованием ПЦР и др. специальных методов контроля	




са качества (SPF). Эта категория качества животных соответствует категории, именуемой во многих странах MD (Minimal Diseases);

✓ ***категория 3***: SPF-животные, содержащиеся в строгой барьерной системе;

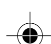
✓ ***категории 4 и 5***: гнотобиоты и безмикробные или аксенные животные, содержащиеся в изоляторах.

Контроль качества животных

Лабораторные животные высокого качества не должны иметь клинических и доклинических заболеваний, вызванных микроорганизмами, нарушениями содержания и питания, отрицательным воздействием окружающей среды, стрессом или врожденными патологиями. Животные определенной генетической линии должны соответствовать характеристикам, присущим данной линии, то есть быть *генетически аутентичными*.

NB! Использование животных низкого качества может привести к необходимости увеличения количества животных для проведения эксперимента, а иногда даже полностью нивелировать результаты опыта и сделать их бессмысленными.

Например, если животные являются носителями *доклинических патологических нарушений*, дополнительный, пусть даже и незначительный стресс, причиненный в процессе содержания или в ходе эксперимента, может привести *к развитию поражения органов или тканей*, вызванного латентно текущим заболеванием. В этом случае подобные нарушения будут ошибочно отнесены к последствиям воздействия, оказанного на животных в процессе исследования.




Выбор линии для опытов может быть обусловлен подверженностью животных определенным заболеваниям, таким, как лейкемия или аутоиммунная анемия. Если же генетическая чистота подобной линии была нарушена, возможно, у некоторых животных данные заболевания не проявятся, но результаты эксперимента, аналогично предыдущему примеру, окажутся недостоверными.

Оценка качества лабораторных животных в процессе содержания и эксперимента должна включать микробиологический и генетический контроль, контроль внешней среды, заключающийся в мониторинге температуры, влажности, освещения, шума и контроле питания.

В соответствии с *Европейской конвенцией* по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004г.), следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных [31].

В особых случаях для молодых или голых особей может требоваться содержание при более высоких температурах. Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству. Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств. Этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Должны учитываться следующие факторы: размер клеточного оборудования, количество животных в одной клетке, методы их удерживания и перемещения, а также используемая система разведения. Другой важной переменной для качества животных является питание. Основные показатели питания должны быть проанализированы и зафиксированы для каждого эксперимента. Дополнительно следует проверять корм на наличие химического загрязнения.

NB! *Контроль качества* животных имеет решающее значение для исследований. Каждое учреждение, использующее животных, должно соблюдать стандартные процедуры обращения с животными, касающиеся размещения, питания, физического обращения, ухода и контроля состояния здоровья.

Важно вести письменный учет процедур, проводимых с животными; обычно для этих целей заводится специальный журнал. В журнал должны заноситься записи о ежедневных наблюдениях, проводимых процедурах и другая текущая информация. Следующие рекомендации, содержащиеся в *Правилах лабораторной практики*, желательно использовать для обеспечения контроля качества животных и ведения журнала.




В организации должны быть приняты стандартные правила обращения с животными:

- ✓ все новые животные, полученные из внешних источников, должны быть изолированы и пройти процедуру карантина согласно ветеринарным требованиям;
- ✓ на начало проведения доклинических испытаний все животные должны быть здоровыми и не являться носителями агентов, способных повлиять на результаты исследования. Если в ходе эксперимента животное заболело или стало носителем какого-либо агента, его необходимо изолировать;
- ✓ заболевшие в процессе эксперимента животные могут получать лечение, если оно не повлияет на результаты исследования. Результаты диагностики, назначенное лечение и его описание, а также даты проведения лечения должны быть документированы и сохранены;
- ✓ теплокровные животные, за исключением грызунов, еще питающихся молоком матери, используемые в лабораторной практике, которых требуется вынимать из клетки, должны быть соответствующим образом идентифицированы (татуировкой, цветным кодом, сережкой, кольцом на ноге и т.д.);
- ✓ вся информация, необходимая для идентификации особи, размещенной вместе с другими животными, должна быть доступна в местах содержания этих животных;

- ✓ при необходимости животные различных видов содержат в разных помещениях. Животные одного вида, но участвующие в различных экспериментах, обычно также содержатся в разных помещениях во избежание искажения результатов эксперимента. Если же их смешение необходимо, должны быть приняты меры для их адекватной дифференциации;
- ✓ клетки, стеллажи и дополнительное оборудование должны очищаться и стерилизоваться с достаточной периодичностью;
- ✓ вода и корм для животных должны периодически проверяться для того, чтобы удостовериться, что уровень их естественного загрязнения не превышает показателей, определенных в протоколе, выше которых загрязнение может повлиять на результаты эксперимента, а о результатах проверки должны быть сделаны записи;
- ✓ подстилки, находящиеся в клетках и загонах, не должны влиять на результаты исследования. Менять их нужно по мере необходимости для обеспечения животному сухости и чистоты;
- ✓ если используются какие-либо препараты против паразитов об этом необходимо делать запись в журнал. Препараты, способные повлиять на результаты исследования, не используются.

Микробиологический мониторинг

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Агенты, в обычных условиях не вызывающие заболеваний, могут вызвать *проблемы* в ходе проведения эксперимента из-за *стресса*, испытываемого животными. Другие агенты, как например лактатдегидрогеназа вируса мышей, может не вызвать заболевания в процессе эксперимента, но исказить его результаты. Учитывая это, желательно использовать как можно более «чистых» лабораторных животных с известным микробиологическим статусом.

Микробиологический мониторинг лабораторных животных посредством ПЦР-реакций, посева флоры на питательных средах, серологических и микроскопических исследований преследует обычно две цели: диагностику заболеваний и контроль микробиологического статуса. Основой диагностики заболевания является микробиологическое обследование, но в ходе ее также учитывается и другая информация, касающаяся клинической картины, репродуктивных функций и патологий. Образцы микробов и пробы, которые необходимо взять у животных, определяются соответственно клиническими и патологическими отклонениями. *Время проведения контроля не фиксировано* и зависит от проявления заболеваний.

В этих целях у случайно выбранных животных из общей популяции берутся пробы для выявления определенных видов микробов с целью выяснения микробиологического статуса животных. Таким образом, эти исследования могут проводиться с целью обнаружения как патогенов, так и непатогенов, то есть микробов, являющихся частью нормальной флоры.

NB! *Микробиологический мониторинг* представляет собой процесс, призванный периодически подтверждать неизменность микробиологического статуса животного или группы животных по сравнению с ожидаемыми показателями.

Микробиологическое обследование чаще всего проводится с целью диагностики заболевания, тем не менее, целесообразно также *проводить плановый микробиологический контроль* таких животных, как мыши или крысы, используемых для точных или долгосрочных исследований. Нет необходимости особо отмечать, что важно исключить вероятность наличия в организме лабораторного животного не только возбудителей инфекционных заболеваний, сопровождающихся явными симптомами, но и *скрытых инфекций*, которые могут *под воздействием стресса*, причиненного в ходе эксперимента, вызвать симптоматические заболевания, а также *исказить или извратить* результаты эксперимента [5]. Преимуществом проведения периодического микробиологического контроля является тот факт, что он позволяет выявлять скрытые инфекции на ранних стадиях.




Несмотря на то, что виды микробов, выявляемых в ходе микробиологического обследования, различны в зависимости от категории животных, анализы на отсутствие патогенов, *опасных для человека* и фатальных для животных, должны проводиться в обязательном порядке, независимо от категории животного. Рекомендуется также проводить контроль потенциальных патогенов, так как их присутствие может исказить результаты экспериментов. Исследование микробов-симбионтов и условно-патогенной флоры у мышей и крыс может проводиться, в том числе, для оценки гигиеничности условий содержания животных. В микробиологический контроль необходимо также включать обследование на наличие паразитов.

Количество животных, у которых необходимо взять пробы для микробиологического контроля, зависит от уровня инфицирования популяции. Например, в случае, если показатель инфицирования превышает 50%, для обнаружения возбудителя достаточно взять анализы у нескольких животных, но если уровень инфицирования ниже 20%, возбудителя можно найти только обследовав, как *минимум, 20 особей*. В случае, если искомые патогены обладают средними и высокими

показателями инфицирования, способными повлиять на результаты исследования, достаточно *обследовать 10 особей*.

С другой стороны, контроль колоний животных рекомендуется проводить *каждые 2-3 месяца*, поскольку высокий уровень антител в организме животного сохраняется в течение нескольких месяцев после инфицирования. Таким образом, исследование присутствующих антител является важной процедурой диагностики в микробиологическом контроле.

NB! При биомедицинских исследованиях лечение заболевших лабораторных грызунов и других животных недопустимо, а больные животные-модели для эксперимента и воспроизводства непригодны и подлежат выбраковке.

Среди наиболее опасных инфекционных заболеваний можно назвать следующие: инфекционная эктромелия мышей и оспа крыс – вирусное заболевание, протекающее в острой и хронической формах, хроническая пневмония крыс вирусной этиологии, характеризующаяся медленным течением и небольшой смертностью, лимфоцитарный хориоменингит – вирусное заболевание, к которому восприимчивы мыши и крысы. Инфекция передается и человеку. Вирусная диарея новорожденных мышей – широко распространенное инфекционное заболевание, характерное для мышей сосунков, среди которых в первые две недели после рождения смертность может достигать 50%. Вирусологические исследования на индикацию носительства оспенной группы и эпизоотической диареи новорожденных мышей проводятся с помощью ПЦР-диагностики, методами серологических реакций (РТГА, РДП), иммунофлюоресценции (ИФ), иммуноферментного анализа (ЭЛИСА). Носительство хламидий определяют методом иммунофлюоресценции.




Бактериологические исследования проводятся культуральными методами с использованием дифференциальных и обогащенных питательных сред с последующей биохимической идентификацией бактерий и серологическим типированием.

Среди паразитарных болезней можно выделить болезни, вызываемые клещами, гельминтами, простейшими и грибами. Данные заболевания относятся к антропозоонозам. Методы обнаружения эктопаразитов включают макроскопический и прямой стереомикроскопический осмотр и микроскопию соскобов кожи, идентификацию обнаруженных паразитов. Методы исследования на наличие эндопаразитов включают полное вскрытие животного, макроскопический осмотр вскрытых органов и их содержимого, микроскопию нативных препаратов, метод декантирования, флотации, метод приготовления посто-

янно окрашенных препаратов и их микроскопию, идентификацию паразитов. С появлением полимеразной цепной реакции (ПЦР) отпала необходимость в выделении возбудителя и очистке его ДНК – для анализа можно использовать очень небольшое количество неочищенного биологического материала хозяина. Преимущества и недостатки основных методов диагностики, используемых в современной клинико-ветеринарной практике, приведены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Сравнительные методы микробиологической диагностики




Метод	Преимущества	Недостатки
Микроскопическое исследование	Простота. Прямое выявление патогенных микроорганизмов. Возможность различения микроорганизмов по морфологическим признакам	Трудоемкость, длительность. Низкая чувствительность. Невозможность различения сходных микроорганизмов. Необходимость высокой квалификации персонала для интерпретации результатов
Культивирование *in vitro* для иммунизации мышей	Обнаружение только жизнеспособных микроорганизмов. Возможность определения вирулентности и инфекционности	Длительность анализа, высокая стоимость. Разные линии животных дают разные ответы. Потеря жизнеспособности в организме животного. Использование животных
Иммунохимические методы	Простота, непродолжительность анализа. Возможность автоматизации. Возможность тестирования большого числа образцов	Не всегда специфичен. Невозможность разграничения острой и латентной форм инфекции
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	Простота, быстрота, высокая чувствительность и специфичность. Прямое обнаружение ДНК возбудителя. Возможность различения разных видов патогенов. Независимость результатов от предыдущих инфекций. Не требует жизнеспособности патогенов. Возможность автоматизации	Невозможность различить живые и мертвые микроорганизмы. Возможность получения ложноположительных результатов

Полимеразная цепная реакция – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических участков молекулы ДНК. Их амплификация – иногда в миллионы раз – осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера, комплементарные

соответствующим участкам ДНК-мишени; 2) ДНК-мишень длиной от 100 до ~35000 пар нуклеотидов; 3) термостабильный фермент ДНК-полимераза, который осуществляет синтез новой цепи ДНК; 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении из следующих трех реакций. *Денатурация*. Образец ДНК выдерживают при температуре 95 °С в течение, по крайней мере, 1 мин. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре дезоксирибонуклеотида. *Отжиг*. Температуру смеси медленно понижают до ~55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК-мишени. *Синтез*. Температуру повышают до ~72 °С – величины, оптимальной для работы ДНК-полимеразы. Начинается синтез новой комплементарной цепи ДНК, инициируемый праймерами.

Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат (амплификатор). Смена температурного режима и его поддержание осуществляются автоматически. Каждый цикл длится 3-5 мин.




Метод полимеразной цепной реакции был предложен в 1985 году К. Мюллисом (США), отмечен Нобелевской премией 1993 г. и назван «изобретением века» [34]. Он позволяет в миллионы раз амплифицировать *in vitro* нужные сегменты ДНК, что делает его очень чувствительным. Это метод произвел настоящую революцию в биомедицине и нашел свое применение во многих ее отраслях. Особенно широко он используется для диагностики многих заболеваний человека и животных, а также для решения задач, связанных с анализом геномов различных организмов (начиная от вирусов и заканчивая человеком). В частности ПЦР применяют для генотипирования, идентификации и паспортизации штаммов микроорганизмов и линий животных, а также для ДНК-маркирования различных фенотипических признаков, таких, как устойчивость к заболеваниям, особенности развития и т.п.

При диагностике различных заболеваний метод ПЦР все чаще используется наряду с такими традиционными методами, как бактериологический и иммунохимический, особенно в таких областях клинической диагностики, как ранняя диагностика вирусных и бактериальных инфекций (в том числе хламидиоза, лептоспироза, листериоза, бруцеллеза, лейкоза); диагностика трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм патогенных микроорганизмов; диагностика хронических и латентных инфекций; идентификация возбудителей с высокой антигенной изменчивостью; идентификация внутриклеточных паразитов (в том числе возбудителя токсоплазмоза).

В последние годы ПЦР активно дополняется современными *протеомными*, *геномными* и *нанотехнологическими* подходами и методами. Они, несомненно, дают меньше ложноположительных откликов, но ограничиваются высокой стоимостью оборудования и реактивов.

Генетический мониторинг

Генетический профиль лабораторных животных крайне важен для успеха эксперимента. Показано, что более 80% ДНК представлено репликативными нуклеотидными последовательностями различной протяженности, причем более половины из них составляет «паразитическая» или «эгоистическая» ДНК, функции которой остаются неизвестными. Лишь 1,2% всей ДНК кодирует структуру молекул белков [2, 21].

NB! Компьютерный анализ геномов человека и линейной мыши показал, что именно в повторяющихся участках ДНК, особенно в «эгоистической» ДНК, закодирована информация, обеспечивающая всю программу индивидуального развития у животных и людей.

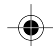
Поскольку любые исследования на животных моделях так или иначе экстраполируются на человека, необходимо учитывать, что повторяющиеся последовательности генома не кодируют белки, но очень важны для поддержания структуры и функции хромосом и содержащихся в них генов. В геноме человека идентифицированы около 1,5 млн. SNP (single nucleotide polymorphisms), т.е. однонуклеотидных замен. Несмотря на то, что число повторов (> 50%) у человека много больше, чем у разных животных и растений, пока идентифицировано около 300 генов, отличающих геном человека от генома лабораторной мыши. Только 94 из 1280 семейств белков, закодированных в геноме человека, свойствены лишь позвоночным, а семейства белков человека, отвечающие за процессы иммунитета, биозащиты и раннего онтогенеза значительно разнообразнее и многочисленнее, чем у животных.

У человека и животных *смысловые* или структурные гены отделены от *бессмысловой* «эгоистической» ДНК длительными монотонными последовательностями из ГЦ-пар, так называемыми *CpG-островками*, которые и регулируют *функциональную активность* генов. В последние годы активно развивается сравнительная геномика, выясняющая гомологию геномов человека и животных, поскольку в экспериментах на последних несравненно проще выясняются функции новых генов. Уже первые сравнения геномов человека и лабораторной мыши показали их высокую гомологию, то есть 80%-е сходство первичной структуры генов.

Чрезвычайно интересную гипотезу выдвинул и В.С. Баранов и его коллеги [2], согласно которой в «бессмысленной» и даже «эгоистичной» фракциях ДНК, а это около 5% ДНК в наиболее консервативной части генома, состоящих из SNP, возможно, закодирована программа всего онтогенеза, сохранившаяся неизменной в течение 75-80 млн. лет, эволюционно разделяющих человека и мышь.

NB! Программа индивидуального онтогенетического развития человека и животных, по-видимому, записана в их геномах каким-то другим языком, отличным от традиционного трехбуквенного кода, используемого природой для синтеза белков.

По крайней мере, до последнего времени самые изощренные научные подходы и попытки секвенирования «эгоистических» ДНК и оценки SNP не увенчались успехом. Почти 100 генов и сотни новых белков идентифицируются в лабораториях мира *ежедневно*. Идет накопление колоссального объема знаний, что не может не дать количественного скачка и создания *информационных матриц* нормы и патологии. Вот почему генетический мониторинг, генетическая однородность и чистота линий животных так важны для исследователей.




Учреждения, занимающиеся лабораторным животноводством, должны уделять особое внимание генетической чистоте животных [5, 10]. В рамках учреждений должны действовать программы по предотвращению генетического загрязнения линий (по вине человека или в результате случайного спаривания) и раннему выявлению мутаций. Каждая линия имеет особый генетический профиль, определить который можно с помощью ПЦР, биохимических, иммунологических и морфологических маркеров. Желательно проводить предварительный генетический контроль до начала эксперимента.

Микробиологическое обследование и контроль, а также генетический мониторинг представляют ряд трудностей ввиду ограниченного доступа к необходимому оснащению лабораторий и реагентам, включая олигонуклеотидные праймеры, качественные питательные среды и антигены для серологических тестов, а также по причине недостаточного количества квалифицированных специалистов. Создание диагностических и ПЦР лабораторий во всех местах содержания лабораторных животных представляется нецелесообразным. Вместо этого целесообразно использовать те центры, которые проводили бы микробиологические обследования, консультировали по вопросам зоогенетики, контроля качества животных и осуществляли подготовку сотрудников для университетов, НИИ и предприятий биомедицинского профиля, как это делается в Центре РАМН.

Refinement: уменьшение дистресса, боли и страданий

Refinement – это улучшение условий содержания лабораторных животных и использования их в экспериментах, уменьшение дистресса животных во время экспериментов и применение обезболивающих средств, но не в ущерб цели эксперимента. С точки зрения внешних проявлений, а также физиологии, животные реагируют на непереносимые боль и дискомфорт так же, как и люди.

NB! Для того чтобы захотеть предотвратить страдания животных, нужно поверить, что животные их испытывают [16, 22].

Даже поверив, что животное может испытывать страдания, и желая предотвратить их, человек может не выполнить обезболивание, если не знает, как это делается или занят своей работой настолько, что забывает об этом. Для регистрации болевых реакций у животных необходимо углубленное изучение особенностей поведения животных и изменения этого поведения при болевых воздействиях. Концепция исследования боли на животных включает в себя представление о том, что животное не должно подвергаться боли в большей степени, чем может выдержать человек. Следует согласиться с И.П. Павловым, что субъективный подход для строгой науки мало приемлем, но отчасти приемлем в биоэтике экспериментирования на животных, если даже считать, что страдание и боль у животных никем субъективно не переживаются и не могут быть оценены и измерены строго объективно [14, 26, 29].




Обездвиживание животных представляет собой комплекс мер физического или фармакологического воздействия, направленный на сдерживание естественной подвижности животного в целях проведения необходимых действий по уходу, обследованию или проведению экспериментальных действий, включая анестезию. Качество полученных результатов напрямую зависит от обращения с животным во время эксперимента. Правильное обращение и обездвиживание может дать животному ощущение безопасности и таким образом уменьшить его боль и испуг. Это не только позволяет в некоторых случаях провести эксперимент без анестезии, но и удовлетворяет принципу гуманного обращения с животными.

NB! Правильное обращение с животными обеспечивает также безопасность персонала и исследователей, поскольку успокаивает животное и снижает его агрессивность.

Персонал должен быть обучен правильному обращению с животными, поскольку физический контакт с ними является частью их ежедневной работы по уходу за животными и их размножению. Ис-

следователи также должны иметь опыт обращения с животными, так как именно они проводят большинство экспериментов. В противном случае желательно, чтобы обученный сотрудник ассистировал исследователю при проведении эксперимента.

Для того чтобы не испугать животное, не причинить ему вред или боль, движения при обращении с ним должны быть осторожными и мягкими. Во многих случаях целесообразно использовать сети и другие специальные приспособления для поимки и обездвиживания животного.

Фиксация животных. В исследованиях на животных возникает вопрос надежной фиксации отдельных частей их тела или всего животного в целом. Без фиксации у собак или других крупных лабораторных животных трудно или невозможно проводить длительные внутривенные введения. Для иммобилизации животных их прикрепляют к столу или специальному устройству в положении на спине. В таком положении трудно проводить манипуляции на животном. Пребывание животных в таком неестественном положении является стрессорным фактором. Процесс фиксации животных в положении *на спине является трудным и вызывает у них агрессивную реакцию.*




Существуют установки для фиксации крупных лабораторных животных, которые позволяют сохранить естественное положение животных, обеспечить надежную иммобилизацию тела всего животного или отдельных конечностей, на которых предполагается определенная манипуляция. Особенность этой установки заключается в том, что и лоток и все стойки для конечностей и для морды легко трансформируются. Детали такой установки можно легко подгонять под любые размеры животных по длине и высоте. В задней части устройства должно быть установлено пластиковое ассенизационно-санитарное устройство. В настоящее время различные фирмы выпускают такие установки.

Игрушечная собака размером с настоящую является хорошей моделью для тренировок. На моделях отрабатывают навыки. Животные же столь неоднозначны по своему поведению, что их во всех случаях и до начала иммобилизационных мероприятий необходимо предварительно приучить к пребыванию в станке. Этому способствует кормление после того, как животное постоит привязанным в станке. После двух-трех таких тренировок животных удается легко фиксировать и проводить необходимые процедуры без помощи посторонних лиц. Для полного обездвижения собаки прибегают к рауш-ингаляционному или неингаляционному наркозу животных.

Позвоночник кролика и других животных очень хрупок. Прыгая и борясь с исследователем, кролик может сломать себе спину. Некото-

рые кролики весьма агрессивны. Поэтому лучше приобретать навыки на моделях-игрушках. Недорогие модели кроликов, крыс и мышей состоят из оболочек, набитых хлопком. Открывающийся рот служит для развития оральных манипуляций. По размеру модели должны соответствовать реальным животным, а материал должен быть похож на их кожу. Стоимость модели не велика, поэтому нетрудно иметь 50 и больше моделей для большого класса. На модели показывают, как правильно вынимать животное из клетки и удерживать его при проведении манипуляций.

При соблюдении правил реальная мышь будет вести себя спокойно. При неправильных действиях, мышь, а особенно крыса, будут вертеться, пытаться вырваться и укусить исследователя. Преподаватель приучает обучаемых бережно относиться к модели, делать все правильно. Другой метод, который может быть отработан на модели, — это введение зонда. Могут быть использованы металлические и резиновые зонды. Процедура может быть продемонстрирована до работы с живым объектом. Для введения жидкостей в вену реальных мышей, хомяков и крыс можно применять специальные методы фиксации.



Мелких грызунов для длительного обездвиживания следует укутать в салфетку или привязать к операционному столу, стараясь не причинять им боль. При необходимости можно вызвать длительную иммобилизацию с помощью наркоза.



Наркоз, обезболивание и эвтаназия

В ряде случаев как острые, так и хронические эксперименты проводятся хирургическими или другими методами, вызывающими резкие болевые ощущения у лабораторных животных. Это ни с физиологической точки зрения, ни с точки зрения гуманности не оправдано. Ведь всякое болевое раздражение вызывает у живого организма глубокую перестройку многих функций и в первую очередь функций центральной нервной системы, сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, а это приводит к искажению полученных результатов. К сожалению, это не учитывается многими экспериментаторами.

NB! Эксперименты, выполняемые хирургическими методами, должны проводиться только после обезболивания, причем до иммобилизации животного.

Расчет обезболивающего лекарственного средства проводится на килограмм или грамм массы тела лабораторного животного. И вводимое вещество, и время действия обезболивающего средства обязательно фиксируется в протоколе эксперимента или в наркозной карте. Если

острый опыт заканчивается смертью животного, его умерщвляют до окончания действия обезболивающего вещества.

Наркоз у животных проводят различными фармакологическими средствами и различными путями (ингаляционный, интратрахеальный, внутривенный, внутримышечный, ректальный). Чаще всего пользуются комбинированным наркозом.

Комбинированный наркоз является наиболее распространенным и общепринятым видом обездвиживания, выключения сознания и обезболивания у лабораторных животных. Этот вид наркоза является наиболее оптимизированным подходом в клинической анестезиологии, что, в свою очередь, делает его приемлемым в необходимых случаях биомоделирования лабораторных животных.

Так, например, при комбинированном наркозе у средних и мелких животных лучше начинать с диэтилового эфира. Внимательно следят за дыханием и тонусом животного, так как в этих условиях легко передозировать наркотик. В состоянии наркоза фиксируют животных к операционному столу и в дальнейшем, по мере необходимости дают наркоз особо осторожно, поскольку барбитураты потенцируют эффекты морфина в отношении дыхательного центра. Лучше применять этаминал натрия (нембутал) в виде 5%-го раствора внутрибрюшинно или подкожно по 40-60 мг/кг. Наркоз наступает через 10-15 мин после введения.




В далекие теперь уже 70-е годы XX столетия автору приходилось выполнять стереотаксические нейрохирургические операции на обезьянах, дельфинах, кошках и кроликах. Тогда не было жестких требований по пресечению незаконного оборота наркотиков и психотропных средств, с одной стороны, и не менее решительных рекомендаций 3R – с другой. В *незапираемых* стеклянных шкафах стояли коробки с морфием, промедолом, фентанилом, а с животными мы работали по тем же канонам, что и с больными в хирургической клинике. Но мир изменился, и использование наркотиков регламентируется во всех странах весьма строгими законами и правовыми нормами.

NB! Исследователи должны безусловно соблюдать все требования законов и директивных документов, регламентирующих оборот наркотических и психотропных средств, а животные-модели не должны при этом испытывать боль, дистресс и страдания.

Для анестезии при небольших хирургических процедурах можно внутримышечно вводить различные нейролептики, фентанил, диазепам, смесь пентобарбитала натрия и скополамина гидрохлорида. Некоторые авторы для длительной анестезии предлагают свой способ, заключающийся в последовательном внутримышечном введении сна-

чала смеси анальгетика мередина гидрохлорида и транквилизатора азаперона, а через 20 мин – смеси наркотиков: кетамина гидрохлорида и сульфата морфия. Недостатком внутримышечного введения обезболивающих препаратов является невозможность регулирования уровня иммобилизации. Этого можно добиться путем внутривенного введения обезболивающих препаратов, например, через ушную вену [35]. Многие исследователи считают наиболее эффективным ингаляционный наркоз, в том числе и с предварительным внутривенным введением барбитуратов. В последнее время нами успешно применяется ксеноновый наркоз.

NB! Следует особо подчеркнуть, что перед дачей наркоза, а во многих случаях и перед началом эксперимента, абсолютно необходима *премедикация или лекарственная подготовка.*

Это безусловные требования, хотя сотрудники маленьких лабораторий и кафедр университетов жалуются на наличие проблем с лицензированием и сертификацией, необходимых для работы с препаратами группы *А*. В отдельных случаях на морских свинках и грызунах нужного эффекта можно достигнуть комбинацией аспирина, новокаина и бупренорфина [5].




Эвтаназия – умерщвление экспериментальных животных применяется только в тех случаях, когда они после проведенного эксперимента остаются не жизнеспособными или испытывают физические страдания, которые невозможно устранить. Возможны случаи, когда эксперимент в соответствии с программой должен завершатся его эвтаназией. Смерть должна быть быстрой, без эмоционального стресса, боли и страданий, с потерей сознания, надежной и необратимой. При доставке животного к месту умерщвления оно не должно подвергаться травме.

Идеальный метод эвтаназии должен включать такие условия, как отсутствие боли, быстрое отключение сознания, быстрая смерть, а также приемы, минимально ограничивающее движение и возбуждение. Они должны подходить по возрасту, виду и состоянию здоровья, вызывать минимум страха и психологического стресса, быть надежными, необратимыми, простыми для наблюдения, безопасными для оператора и эстетически допустимыми [16].

Существуют *физические и химические* методы эвтаназии экспериментальных животных. Физические методы включают оглушение, декапитацию и перелом шейных позвонков, химические – использование ингаляционных средств (CO, CO_2), летучих обезболивающих средств (галотан, энфлуран и др.) и снотворных (барбитураты и др.).

Самый оптимальный метод умерщвления животного – передозировка наркоза. В острых случаях животное умерщвляется до окончания действия наркоза. В тех случаях, когда умерщвление осуществляется углекислым газом (CO_2), следует помнить, что его высокая концентрация может вызвать стресс у экспериментальных животных. Использовать необходимо только сжатый CO_2. Наименее эффективен CO_2 для крыс и мышей по сравнению с *галотаном* (для крыс) и *энфлураном* (для мышей). Некоторые авторы [16] считают, что CO_2 должен применяться при эвтаназии или анестезии мелких грызунов только в сочетании с галотаном. Оба газа (CO и CO_2) перед бессознательным состоянием вызывают легочное кровотечение. Кроме того, CO_2 при концентрациях больше чем 50% может вызвать припадки, носовые кровотечения, вставание на лапки, дефекацию, сильное слюнотечение. С большой осторожностью необходимо подбирать метод эвтаназии для новорожденных лабораторных животных.

NB! Оценка гуманности метода эвтаназии всегда сложна, на крупных видах она должна обязательно включать ЭЭГ, по которой определяются спонтанные или вызванные потенциалы и распознаются поведенческие реакции животного.




Поведенческие сигналы распознаются по следующим показателям: звуки голоса; мочеиспускание и дефекация; потливость; борьба; защитная или переадресованная агрессия; расширение зрачков; тахикардия; слюнотечение.

При декапитации грызунов измерение уровня *кортикостерона* более полезно при оценке потенциального стресса, но ЭЭГ является наиболее общим средством для оценки гуманности декапитации. Не менее важно учитывать и участие сторонних наблюдателей при оценке гуманности метода эвтаназии животных, которые подвергались некорректной эвтаназии или тех, которые откликались медленнее или абберантнее на примененный метод. Например, в исследовании по изучению мозговых импульсов при декапитации крыс среднее время ЭЭГ составило 13-14 секунд, а у одного животного это время составило 29 секунд [9]. В предыдущей книге [5] мы подробно изложили методики наиболее щадящих принципов эвтаназии, к которой и отсылаем читателей.

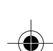
Биобезопасность при работе с животными

ВОЗ зарегистрировала до 200 зоонозов, то есть заболеваний прямо или косвенно передающихся от животных человеку. При прямой передаче для возникновения зоонозов необходим только контакт.

Циклозоонозы вызваны микроорганизмами, для размножения которых необходимы два вида позвоночных существ. Возбудители *метазоонозов* развиваются в беспозвоночных организмах, например в насекомых. *Сапрозоонозы* могут сохраняться в минеральной почве в течение долгого времени. Наиболее часто встречающиеся зоонозы: туберкулез, бруцеллез, оспа, псевдотуберкулез, сальмонеллез, рожа, пастереллез, листереллез, бешенство, орнитоз, пситтакоз, трихофития, токсоплазмоз, эхинококкоз, тениоз, туляремия и ботулизм. Многие из них вызывают у человека тяжелые заболевания [5, 7, 11].

Таблица 1.3

Биологические опасности антропозоонозов и групповые номера уровня опасности для человека в классификации Консультативного комитета ВОЗ по опасным патогенам (2002)

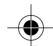



Виды патогенов	Возбудители и их «хозяева»-животные	Групповые номера
	Кролики, крысы, хомяки, мыши и другие грызуны	
Бактерии	Salmonella (например, S. Typhimurium) Yersinia pseudo-tuberculosis Actinobacillus moniliformis (крысиная лихорадка)	2 2 2
Лептоспиры	Leptospira (разл. виды) Lymphocytic choriomeningitis	2 3
Вирусы	Sendai (вирус) Hantaan (вирус)	2 3
Грибы	Trichophyton Micosporon	2 2
Паразиты, гельминты	Hymenolepis nana (The dwart tapeworm)	2
	Птицы и другие летающие виды	
Бактерии	Salmonella	2
Вирусы	Вирус болезни Newcastle Вирус $H_5 N_1$ – птичий грипп Пситтакозы и орнитозы	2 3
Грибы	Aspergillus Candida	2 2
	Собаки, кошки и другие хищники	
Бактерии	Salmonella Pasteurella Возбудитель кошачьей лихорадки (Cat-scratch fever agent)	2 2 Не классифицирован
Лептоспиры	Leptospira иктерогеморрагическая	2
Вирусы	Кроличьи вирусы (специфические)	3
Грибы	Microsporum	2
Паразиты и гельминты	Toxoplasma Гонди Toxocara (собачья) Ancylostoma Echinococcus granulosus Sarcoptes scabiei Ctenocephalides (canis)	3 2 2 3 Не классифицирован Не классифицирован

Таблица 1.3 (*окончание*)

Виды патогенов	Возбудители и их «хозяева»-животные	Групповые номера
	Мини-свиньи, овцы и иные крупные животные	
Бактерии	Bacillus anthracis (сибирская язва)	3
	Brucella species	3
	Mycobacterium tuberculosis	3
	Staphylococci	2
	Clostridia	2
	Erysipelothrix	2
Вирусы	Q fever (Coxiella burnetti	2
	H_5N_1 – птичий грипп	
	Cow Pox (чума коров)	2
Паразиты и гельминты	Entamoeba histolytica	2
	Giardia muris	2
	Balantidium coli	2

При проектировании помещений для лабораторных животных следует предусмотреть их изоляцию от персонала лаборатории в случае необходимости, а также возможность деконтаминации и дезинфекции.




Проектирование помещений для животных, так же как и лабораторий, должно осуществляться с учетом степени опасности исследуемых микроорганизмов. Здесь также выделяют четыре уровня биологической безопасности (1, 2, 3, и 4). Во внимание принимаются и иные факторы, такие, как объем и концентрация исследуемого патогенного агента, путь заражения животного и возможный путь выведения агента из организма животного. Учитывают особенности животного: его агрессивность или способность кусать или царапать, его природные экто- и эндопаразиты, зоонозные заболевания, которым подвержено данное животное, а также возможное распространение аллергенов.

Правила биозащиты персонала

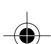
Определенные требования существуют и к оснащению лаборатории, ее проектированию, причем меры предосторожности усиливаются по мере возрастания уровня биологической безопасности лаборатории [6, 10]. Эти требования кратко представлены в табл. 1.4.

В процессе подготовки персонала для лабораторий, в которых содержатся животные, необходимо уделять должное внимание наблюдению за состоянием здоровья и принятию превентивных мер. Работа должна быть организованна таким образом, чтобы избегать излишней *физической нагрузки* на конечности сотрудников, а также на плечевой пояс и спину. Многие нарушения опорно-двигательной системы имеют тенденцию к хронизации.

Таблица 1.4

Лабораторные животные и уровни биологической безопасности: свод правил работы и перечень безопасного оборудования

Уровень безопасности	Группа риска (ГР) и лабораторная практика	Средства обеспечения безопасности
1. Большинство лабораторных. животных (за исключением приматов) и животные, зараженные инфекционными агентами группы риска I	ГР I. Ограниченный доступ, защитная одежда и перчатки. Должна быть хорошая микробиологическая подготовка (ХМТ)	Средства индивидуальной защиты и гигиены, микробиологическая техника
2. Работа с лабораторными животными, зараженными инфекционными агентами группы риска II. Соблюдение необходимых предосторожностей	ГР II. Ограниченный доступ и знаки биологической опасности; защитная одежда и перчатки; деконтаминация отходов и клеток перед уборкой	I и II классы боксов биологической безопасности (БББ) для видов работ, сопровождающихся образованием аэрозолей; средства индивидуальной защиты
3. Работа с лабораторными. животными, зараженными патогенными агентами группы риска III. Приемлемы все рекомендации, разработанные для лабораторий, уровней биологической безопасности 1 и 2	ГР III. Контролируемый доступ; специальная защитная одежда; остальное, как для уровней 1 и 2	I и II классы БББ для всех видов работ; средства индивидуальной защиты
4.Работа в максимально изолированной лаборатории – группа риска-IV. Применяются все правила работы с лабораторными животными для уровней биологической безопасности 1, 2, 3	ГР IV. Строго ограниченный доступ; 3-й уровень деятельности плюс помещения для переодевания и душевые; все отходы деконтаминируются перед удалением из помещения	Класс III БББ или ламинарные костюмы с положительным давлением



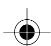

NB! Нарушения опорно-двигательного аппарата, дыхательной системы и кровообращения также препятствуют утверждению кандидатуры персонала, поскольку работа с животными предполагает высокую физическую нагрузку.

При медицинском обследовании до приема на работу рекомендуется проводить тесты на *аллергические реакции*. Также необходимо проверять кандидата на носительство некоторого вида бактерий. Человек, в организме которого эти бактерии присутствуют, не должен работать с животными, поскольку может передать им эти микробы. Необходимо также вести наблюдение за респираторными функциями, сделать флюорографию. Рекомендуется брать образцы сывороток, для

того чтобы в случае возникновения зоонозов, можно было провести анализы.

Уход за животными подразумевает частое поднимание самих животных, их клеток, поилок и корма. Если в клетках есть подстилки, то они должны быть вычищены раз или два в неделю, иначе будет превышен уровень аммиака. Клетки с животными часто расположены на стеллажах в несколько рядов. Ввиду ограниченности пространства клетки располагают как на очень низком, так и на очень высоком уровне. Для того чтобы достать клетку с нижнего стеллажа придется нагибаться, а с верхнего – тянуться с руками, поднятыми под углом больше 90°. Нагрузка в таких случаях существенно превышает нормальную.

Большая нагрузка возникает и при работе с *изоляторами*. Даже в гибком пластиковом изоляторе сложно достать до всех углов и приходится поднимать существенный вес на вытянутых руках. Исследования показали, что при работе с изоляторами нагрузка на треть превышает максимальное добровольное мышечное сокращение. Сотрудники лабораторий в связи с этим должны уделять внимание своей физической подготовке и состоянию здоровья.




NB! При работе с лабораторными животными в качестве абсолютного постулата следует принять, что *здоровый персонал более ценен для учреждения, чем самое высокое качество животных.*

Содержание лабораторных животных в питомниках и ЭБК создает потенциальную возможность взаимного инфицирования человека и животных (антропозоонозы), а также перекрестного инфицирования животных, во избежание чего необходимо строгое соблюдение правил личной гигиены работников. Персонал, работающий с животными, дважды в год должен обследоваться в медицинском учреждении по правилам, действующим для пищевой промышленности; носители патогенной для животных флоры, включая антропозоонозы, как и больные люди, к работе с животными не допускаются. Персонал питомника и ЭБК должен быть обеспечен требуемым количеством спецодежды, санитарная одежда должна быть персонально маркирована.

Вход персонала в «чистую» зону помещения барьерного типа производится через санпропускник, работник снимает одежду, кольца, цепочки, серьги и др. и оставляет их в шкафу «грязной» раздевалки санпропускника, принимает душ и одевается в полный комплект стерильной одежды. Очки протираются дезраствором. В *течение рабочего дня работник из чистой зоны не выходит*. В случае экстренного выхода процедура входа в «чистую» зону через санпропускник полностью повторяется заново. Таким же образом входят в чистую зону сотрудники, выполняющие эксперимент на животных, и при необходимости

технические работники. Рабочий инструмент подвергается автоклавированию или дезинфекции и проводится через шлюзы. Персонал обеспечивается в необходимых количествах мылом и кремом для ухода за кожей. В помещениях с животными питомника и ЭБК необходимо иметь емкости с дезинфицирующими растворами для обработки рук.

NB! Работа с лабораторными животными – это не прогулка в парке с любимой собакой. Это тяжелая, сложная и опасная работа, и каждый новый сотрудник должен это осознавать и быть к ней готов.

Сотрудники, работающие с лабораторными животными, должны *ежегодно* проходить медицинское обследование. Для подтверждения или исключения причин заболеваний могут потребоваться дополнительные лабораторные анализы. Респираторные функции сотрудников должны контролироваться независимо от их нарушений. Рекомендуется проводить раз в 3 года медицинское обследование персонала, сходное с проводимым при приеме на работу и включающее сдачу образцов сыворотки.



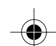

Работа с лабораторными животными и производство биологических образцов для опытов требуют специализированной подготовки. Особое значение имеет квалификация сотрудников питомников, так как работа с лабораторными животными требует особого соблюдения норм биобезопасности. Существует опасность инфицирования человека болезнетворными бактериями и микроорганизмами, но человек и сам может являться носителем микробов, способных передаваться животным.

NB! С точки зрения биобезопасности, чем меньше контакт с животными и ближе к началу эксперимента, тем меньше риск заболевания. Из лиц, изначально страдавших от ринита или конъюнктивита, у половины, скорее всего, разовьется астма.

Сотрудники лаборатории должны представить личную и семейную историю болезни, касающуюся *аллергий*. Уже существующая аллергия на какой-либо вид животного, обычного для лаборатории, является явным противопоказанием. Развитие аллергических реакций одна из серьезнейших проблем работы в лаборатории с животными. У четверти сотрудников в процессе работы развивается аллергия на перхоть, мочу или кровь животных. *Продолжительность* нахождения в контакте с аллергеном до возникновения симптомов может быть *от полугода до двух лет*. Исследователи, находящиеся в долгом контакте с животным, предназначенным для опытов, могут проявлять *гиперчувствительность*. Поэтому ранний перевод животных в исследовательские лаборатории нежелателен.

Профилактика аллергических заболеваний заключается в использовании перчаток и масок при контакте с животными. Животные должны содержаться отдельно от рабочих мест сотрудников. У гиперчувствительных людей часто обнаруживали аллергические реакции на пыль, состоящую из эпителиальных клеток животных. Белки, содержащиеся в выделениях животных, таких, как моча или слюна, также являются мощными антигенами. Исследования показали, что уровень содержания животного протеина в воздухе обратно зависим от степени вентиляции помещения. В связи с этим рекомендуется оснащение лаборатории локальной вентиляцией и ношение персоналом индивидуальных масок.

Исследователи и техники также находятся в контакте с потенциальными аллергенами, работая с животным или его тканями. Они должны соблюдать те же правила, что и основные сотрудники. Несмотря на следование правилам обращения с животными, последние, как ни странно, *иногда кусаются*. В момент укуса в ткани человека заносятся не только антигены, но болезнетворные бактерии, чего следует не только остерегаться, но и опасаться.




От экспериментов на животных к «моделям животного»

Современные технологии существенно отличаются от тех, которые были во времена Russell'а и Burch'а полстолетия назад [30]. Традиционный «рецепт» эксперимента на животном — *взять животное*, добавить изучаемую субстанцию или разрушить структуру и описать последовательность — существенно изменился.

NB! Больше нельзя просто «взять животное», а следует выбрать нужное между все возрастающим числом хорошо описанных видов животных, *инбредных трансгенных*, *нокдаунных и нокаутных* линий.

Тем более что появляется возможность создать полную новую «модель животного» по современным молекулярным технологиям, которые заменяют традиционные насильственные методы и принципы «добавить и разрушить».

В биомедицине, и особенно в инновационной фармакологии, мы вскоре перейдем от выбора животных *для эксперимента* к созданию специализированных линий *под задачи исследования*. Тогда планирование эксперимента начнется с постановки задачи для специалиста-фармакогенетика по получению нокаутных или трансгенных животных под будущее лекарство.

Вместо скальпеля и химических субстанций в ядре клетки будут создаваться генетические конструкции, позволяющие выявить влияния на биохимическом уровне. Последовательность наших научных изыс-

каний уже не является такой очевидной, как в ситуации «манипуляция сама по себе», так как они включают сложные молекулярные технологии, такие, как наблюдение за моноклональными антителами и ПЦР-маркерами для проверки изменений в белках и ДНК [17, 18, 36].

Это отнюдь не фантазия. Такие предпосылки уже имеются. Когда создается новая генетически модифицированная (ГМ) модель мыши, меняется сама суть, а соответственно, понятие и определение нового вида «эксперимента». В системе «новых экспериментов» следует выделить *четыре фазы*: получение овоцитов из суперовулированных самок мышей (*фаза 1*); отбор и имплантация удачных эмбрионов в суррогатных матерей (*фаза 2*); маркировка новорожденных детенышей и генетический анализ тканей (*фаза 3*); программы кросс-бридинга, включающие получение, создание запаса животных, дополнительный генетический анализ (*фаза 4*).

NB! Биоэтические принципы создаются в изменившихся условиях научных методологий, с учетом особенностей каждой страны и длительных перспектив, но с первоначальной задачей стимулирования развития концепций аккуратного использования лабораторных животных.



Основные же условия использования животных в эксперименте: научная методология, возможность применения принципа трех R, оценка баланса между страданиями животных и важностью целей исследования. Хотя этические нормы в большинстве своем подразумеваемы, редко бывают научными. Однако некоторые из них несомненны: *научные,* в виде составления плана на основе подходящей методологии; *экономичные* для уменьшения количества животных; *эмпатичные,* в форме использования методов, уменьшающих страдания и дискомфорт; *скромные*, то есть использование клеточных культур вместо животных. Пятое, как баланс и основа логики – *этический принцип пропорциональности.*

Если на каждой из фаз *уровень дискомфорта* оценивается как средний, то мы можем оценить и эксперимент в целом как имеющий уровень *среднего дискомфорта.* В современных генетических исследованиях на животных один «эксперимент» включает различные действия или *фазы* с различными животными: животными-донорами, животными-суррогатными матерями, «покалеченными» животными, линиями животных. Все эти действия необходимы для ответа в отношении одной единственной цели эксперимента, и это основное в переходе от традиционной концепции эксперимента на животном к исследованиям на моделях животных.

Последовательность шагов понятна, однако большинство исследователей пока не рассматривают все стадии, а продолжают оценивать



эксперимент на животном только на основе конечной фазы, а именно использования экспериментальных животных в *провокационных экспериментах* для тестирования удачности модификации. Они не считают, что предыдущие *четыре фазы* являются также фазами эксперимента. Таким образом, животные, участвующие на первых четырех фазах, не учитываются в отчетах официальной статистики и их этическая оценка не осуществляется.

Таблица 1.5

Биоэтические аспекты использования животных-моделей и переход к «моделям животных» по схеме 4 фазы + 1

Принцип	Зооцентрический		Антропоцентрический
Теория	Классическая	Новая (позиция ученых)	Позиция общества
Очистка или Refinement	Боль, страдания, стресс	5-фазная схема. ГМ животные-модели	Оценка общего плана «Модели животных»
Цели	Научные цели	Успех манипуляций	Польза для общества
Снижение или Reduction	Статистика инбредных линий. Генетически измененные линии	Экстра-кросс разведение (анималломика). Квалифицированные генные инженеры. Продажа линий	Рост числа животных. Тревога от патентования «жизни» животных. Биотрансформы. Целломика
Замещение или Replacement	Стимулирование клеточных культур 4 фазы + 1	Стимулирование генетически модифицированных клеточных культур	Получение жизни *in vitro* может быть рискованным последствием для общества

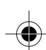



С теоретической и этической позиций существуют два угла зрения и учета первых четырех фаз опыта. В одном случае необходимо оценить перспективу для животного — это *зооцентрическая перспектива*, когда максимальный уровень дискомфорта для животного не должен превышать «среднего» уровня, в другом — мы должны оценивать критическое отношение в обществе — *антропоцентрическая перспектива*. Следовательно, планируя эксперимент, мы должны принимать во внимание оценку всех его стадий, на которых может возникнуть дискомфорт. Таким образом, эксперимент разбивается на множество шагов, которые могут включать средний дискомфорт, после чего оценивается вся совокупность. В противовес «простой» традиционной схеме эксперимента, этот современный *пятифазный подход* может оказаться менее проблематичным, так как наличие нескольких фаз со средним дискомфортом может сделать оценку всего эксперимента выше среднего уровня [8, 26, 27].

Стремительное развитие молекулярной медицины, генной инженерии породило огромное древо новых биомедицинских технологий.

Если условиться с терминологией, подразумевая, что *транскриптом* – это все транскрибируемые РНК-последовательности, *протеом* – это все белки, кодируемые геномом, а *метаболом* – это межбелковые взаимодействия в процессах обмена веществ и жизнедеятельности организма, то можно выстроить структуру партитуры «Оды жизни» не т*олько животных, но и человека будущего: геном → транскриптом → протеом → метаболом → биотрансформ.* В данном случае *биотрансформ* – это не только трансформация в организме, но и биотрансформация самого организма. Моделирование этих процессов – процесс не быстрый. Возможно, весь XXI век уйдет на познание фенотипических полиморфизмов от клеточного до организменного уровня человека, как прототипа всех возможных биомоделей.

Если ген является элементарной структурой наследственности, то клетка – элементарная единица жизни, поскольку любые молекулы, от самой малой до РНК и ДНК, работают только в клетке.



NB! Мировая научная кооперация усиленно работает над искусственным созданием автономной клетки, которая, будучи максимально миминизированной, несла бы в себе все признаки живого организма. Не меняя своих свойств, она могла бы реагировать на раздражители, размножаться, клонироваться, взаимодействовать с лекарствами, нейтрализовать ксенобиотики, саморегулироваться по принципу обратной связи.



Подобные современные тенденции в биологии, цитологии, геномике, транскриптомике, протеомике, биоинформатике, бионике объединяются, а сумма знаний интегрируется в новом научном направлении – *целломике* (от cell – клетка) [2].

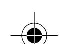
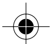
Возможно, эта интеграция займет десятилетия, возможно, и больше. Но когда цели определены, они будут достигнуты. Вопрос лишь в том, что дальше? Ведь появившийся новый термин «генные сети», отражающий системную реакцию клеток и механизмов их реагирования на развитие патологических процессов, температуры, факторов дыхания и питания, стресса и экономических взаимодействий, это прежде всего попытка понять суть межгенных корреляций не между отдельными генами, а в сложных регуляторных процессах их невообразимого множества. А коль скоро мы говорим о роли «генных сетей», значит, завтра встанет проблема взаимоотношений между «минимальными» автономными клетками и потребуется создание научного направления типа «мультицелломики».

Мы хорошо знаем из курса школьной арифметики, что два пассажира, находящиеся в точках *A* и *B*, могут встретиться в одной из них, но если они двинутся навстречу, то в точке *C* их встреча произойдет в

два раза быстрее. Поэтому создание «моделей животных» и концентрация усилий ученых в направлении, назовем его условно «анималломикой», позволит быстрее расшифровать метаболические цепочки, связывающие разные гены. А это, в свою очередь, позволит сделать упор на расшифровке мультифакториальных и полигенных болезней.

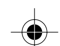
Выбор метода для *замены* животных изначально был мотивирован нами снижением количества живых животных в опыте. Но в методах *in vitro* уже очевидны альтернативы, которые в большей степени перекрывают риски страданий, нежели в вивисекционных экспериментах. Однако в эру новой биомедицины и биотехнологий жизнь может быть изучена не только в организме, но и в отдельных клетках вне животного. Можем ли мы считать данные созданные существа альтернативами? На современном этапе развития науки на этот вопрос следует ответить утвердительно, рассматривая его как концептуальное пространство создания новых «моделей животных», что существенно изменяет наши взгляды на пути поиска новых лекарств и предопределяет новые основы инновационного фармакомоделирования.

Литература

1. *Болотских Л.А., Лушникова З.С.* Усовершенствованный способ получения гнотобиологических животных // *Биомедицина, № 1, с.114-117, 2006.*
2. Геномика – медицине. – *М.: ИКЦ «Академкнига», 2005, 392 с.*
3. *Гиппократ* Избранные книги / Пер. с греч. проф. В.И.Руднева.). – *М.: Сварог, 1994.*
4. *Капанадзе Г.Д.* Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // *Биомедицина, № 2, с. 40-51, 2006.*
5. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – *М.: Изд-во ВПК, 607 с., 2004.*
6. *Каркищенко Н.Н.* Лекарственная профилактика в повышении популяционной резистентности к биологическим факторам // *Вестник РАМН, № 10, с. 19-24, 2002.*
7. *Каркищенко Н.Н.* Лекарственная профилактика – новый путь защиты при биотерроризме и биокатастрофах // Медицинская кафедра, № 4, с. 4-9, 2002.
8. *Каркищенко Н.Н.* Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // *Биомедицина, № 1, с. 5-17, 2005.*
9. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – *М.: Изд-во ВПК, 320 с., 2007.*
10. Лабораторные животные. Положение и руководство / Под ред. и при участии чл.-корр. РАМН Н.Н.Каркищенко. – М.: Изд-во ВПК, 138 с., 2003.
11. *Лапин Б.А., Джакидзе Э.К., Крылова Р.И. и др.* Инфекционная патология обезьян: краткая характеристика, возможности экспериментального изу-

чения, биобезопасность для человека при содержании обезьян в приматологических питомниках и лабораториях // *Вестник РАМН, № 4, 43, 2004.*
12. *Подопригора Г.И.* Медицинская гнотобиология. – *М.: Мед. информ. агентство (МИА), 2003.*
13. *Чуич Н.А., Рябчиков О.П., Марданова Г.В., Осипов В.В.* Реакция бласттрансформации лимфоцитов плода мини-свиньи на конковалин А // *Сб. науч. трудов «Актуальные вопросы современной гистопатологии». – М., с.107-108, 1990.*
14. *Шевелев Н.С., Афанасьев Г.Д., Грушкин А.Г.* Биоэтика в сельскохозяйственных физиологических экспериментальных исследованиях на животных. – *М., 76 с., 2005.*
15. *Bottermann H.* Animal welfare aspects in case of therapeutical emergency // *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift, 110, pp. 205-206, 2003.*
16. *Carbon L.*, Baumans V., Morton D.B. Report of the workshop on euthanasia guidelines and practices // *ATLA ,32, Suppl. 1, pp. 445-446, 2004.*
17. *Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G. et al.* Green fluorescent protein as marker for gene expression // *Science, 263:802-5, 1994.*
18. Cubitt A.B., Heim R. et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins // Trends Biochem Sci, 20:448-55, 1995.




19. *Dantzer R.* The pig as model for behavioral research // *Lab. Anim. Sci., 362, 1986-36.*
20. *Dey G., Foster S.* Veterinary authorities and animal welfare ordanizations – is cooperation possible? // *Deutsche Tierar.e Wochen., 110, pp. 199-205, 2003.*
21. *Festing M.F.W.* Inbred strains in biomedical research // *ATLA, 26, pp. 283-301, 2002.*
22. *Festing M.F.W.* International index of laboratory animals. – *Carshalton: MRC Lab. Anim. Centre, 141, 1980.*
23. *Festing M.F.W., Blackmore D.* Life span of specified-pathogen-free MRC category 4 mice and rats // *Lab. Anim., 5, pp. 179-192, 1971.*
24. *Festing M.F.W.* Good experimental design and statistics can save animals, but how can it be promoted? // *ATLA, vol. 32, suppl. 1A, pp.133-136, 2004.*
25. *Forster S., Henderson P.* Wants stand on animal-friendly farming // *J. of the American Veterinary Medical Association, 222, p. 1504, 2003.*
26. *Gross D.R., Tranquilli W.J., Greene S.A. et al.* Critical anthropomorphic evaluation and treatment of postoperative pain in rats and mice // *J. of the American Veterinary Medical Association, 222, pp. 1505-1510, 2003.*
27. *Koch V.* Reporting noncompliance in the animal facility // *Lab. Animal, 32, 27, 2003.*
28. *Marques P.F., Oliveira M.E., Franca A.S. et al.* Modeling and simulation of pulsatile blood flow with a physiologic wave pattern // *Artificial Organs, 27, 478-485, 2003.*
29. *Mirkes R.* The wrongs of animal rights // *The National Catholic Bioethics Quarterly, No. 3, pp. 287-307, 2003.*

30. *Russell W.M.S., Burch R.L.* The principles of human experimental technique. *– London, UK: Methuen. 238 pp., 1959.*
31. *Shalev M.* European Commission proposes radical overhaul of animal transport rules // *Lab Animal, 32, p. 16, 2003.*
32. *Swindle M.M.* Swine as replacement for dogs in the surgical teaching and research laboratory // *Lab. Anim. Sci., 4, pp. 383-385, 1984.*
33. *Swindle M.M., Horneffer P.J., Gardner T.J.* Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine // *Lab. Anim. Sci., pp. 357-361, 1986.*
34. *Weiss J.B.* DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections // *Clin. microbiol. Rev. V. 8., pp.113-130, 1995.*
35. *Wingfield W.E., Tumblesson M.E., Hicklin K.W. et al.* An exteriorized cranial vena caval catheter for serial blood sample collection from miniature swine // *Lab. Anim. Sci., 359, 1974.*
36. *Yang M., Baranov E, Jiang P. et al.* Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. // *Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:1206-11.*



